

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re PATENT Application of:)
Jérôme AUCOUTURIER et al.)
Serial No. (TO BE ASSIGNED)) Attn: Applications
Filed: October 30, 2000) Branch
For: NOVEL VACCINE)
COMPOSITION AND USE OF)
SURFACTANTS AS)
ADJUVANTS OF IMMUNITY) Date: October 30, 2000

JC930 U.S. PRO
09/698121
10/30/00

TRANSMITTAL OF CERTIFIED PRIORITY DOCUMENT

Assistant Commissioner for Patents

Washington, D.C. 20231

Sir:

The benefit of foreign priority under 35 USC 119 is claimed of Application No. 99 13618, filed October 29, 1999, in France.

Submitted herewith is a certified copy of the priority document to perfect the claim of priority.

Acknowledgment is respectfully requested.

Respectfully submitted,



Robert M. Schulman
Registration No. 31,196

NIXON PEABODY LLP
8180 Greensboro Drive, Suite 800
McLean, Virginia 22102
(703) 790-9110
(703) 883-0370 (Fax)

THIS PAGE BLANK (USPTO)



L'AIR LIQUIDE
3

Jc931 U.S. PRO
09/698121



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 14 SEP. 2000

Pour le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Martine PLANCHE'.

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

cerfa
N° 55-1328

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 29 OCT 1999		L'AIR LIQUIDE, S. A. Service Brevets et Marques 75 quai d'Orsay 75321 PARIS CEDEX 07 FRANCE	
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT 75 INPI PARIS		n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone 05670 S.5062/PhC/FC 01.40.62.56.91	
DATE DE DÉPÔT 29 OCT. 1999		date	
9913618			
2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen 			
Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non			
Titre de l'invention (200 caractères maximum) NOUVELLE COMPOSITION VACCINALE ET UTILISATION D'AGENTS TENSIOACTIFS COMME ADJUVANTS D'IMMUNITÉ			
3 DEMANDEUR (S) n° SIREN code APE-NAF		Forme juridique	
Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination		SOCIETE ANONYME A DIRECTOIRE ET CONSEIL DE SURVEILLANCE	
SOCIETE D'EXPLOITATION DE PRODUITS POUR LES INDUSTRIES CHIMIQUES SEPPIC			
Nationalité (s)			
Adresse (s) complète (s) française		Pays	
75, Quai d'Orsay 75321 PARIS CEDEX 07,		FRANCE	
En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre <input type="checkbox"/>			
4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée	
5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		<input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission	
6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE		nature de la demande	
pays d'origine		numéro date de dépôt	
7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°		date n° date	
8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire)		SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI	
 Philippe CONAN			



DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Pétersbourg S 5062/PhC/FC
75800 Paris Cedex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR
(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

TITRE DE L'INVENTION :

**NOUVELLE COMPOSITION VACCINALE ET UTILISATION D'AGENTS
TENSIOACTIFS COMME ADJUVANTS D'IMMUNITE**

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

Philippe CONAN
L'AIR LIQUIDE, SA
75, Quai d'Orsay
75321 PARIS CEDEX 07, FRANCE

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

AUCOUTURIER Jérôme, 26 avenue Jean-Jaurès, 92290 CHATENAY-MALABRY,
FRANCE
GANNÉ Vincent, 7ter avenue Jeanne d'Arc, 94210 LA VARENNE SAINT HILAIRE,
FRANCE
TROUVE Gérard, 134 chemin du Roze, 81100 CASTRES, FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

Paris, le 29 Octobre 1999

Philippe CONAN

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

La présente invention concerne de nouveaux adjuvants pour compositions 5 vaccinales ainsi que des compositions comprenant au moins un antigène, notamment un antigène d'origine virale, bactérienne ou parasitaire et au moins un adjuvant.

Le développement de vaccins inactivés ou contenant des antigènes purifiés est de plus en plus important, car il permet d'éviter les effets secondaires 10 désirables. Cependant, l'amélioration de la qualité des antigènes se fait au détriment de leur caractère immunogène. C'est pour cette raison qu'ils sont associés à des adjuvants d'immunité.

Les adjuvants d'immunité sont des produits qui augmentent les réactions 15 du système immunitaire, lorsqu'ils sont administrés en présence d'antigènes d'origine virale, bactérienne ou synthétique. Ils provoquent l'apparition massive de macrophages au site d'injection, puis dans les nódules lymphatiques, accroissent la production d'immunoglobulines spécifiques, les anticorps, et stimulent de nombreuses cellules impliquées dans les mécanismes de la défense immunitaire.

Ces adjuvants sont de natures diverses. Ils peuvent par exemple consister 20 en des liposomes ou des émulsions.

Les adjuvants de Freund très efficaces ; ils résultent de l'asscciation d'une huile minérale et d'un ester de mannitol contenant ou non une mycobactérie tuée. Les vaccins réalisés par mélange en part égale d'un adjuvant de Freund avec un milieu antigénique aqueux, restent encore les référence dans le monde entier 25 pour les études en laboratoire. Ils se présentent sous forme d'émulsions eau dans huile (E/H), c'est à dire d'émulsions dans lesquelles la phase continue est l'huile. Ces émulsions sont très visqueuses ; elles sont donc difficilement injectables ; elles sont aussi peu stables, puisque des déphasages sont observés quelques jours seulement, après leur préparation.

30 Comme adjuvants usuels, il y a aussi des sels de métaux, tels que l'hydroxyde d'aluminium, le nitrate de cérium, le sulfate de zinc, l'hydroxyde de fer colloïdal ou le chlorure de calcium. Parmi ceux-ci, l'hydroxyde d'aluminium est le plus cou-

ramment utilisé. Ces adjuvants sont décrits dans l'article de Rajesh K. Gupta et al "Adjuvants, balance between toxicity and adjuvanticity", Vaccine, vol. 11, Issue 3, 1993, pages 993-306. Ils présentent cependant une faible efficacité immunostimulante et induisent parfois, lorsque ces compositions thérapeutiques sont injectées, la formation de lésions et autres réactions locales, telles que les granulomes, au point d'injection.

Plus récemment, il a été découvert que les sels hydrosolubles de métaux divalents ou trivalents étaient de bons adjuvants de l'immunité notamment le gluconate de manganèse, le gluconate de calcium, le glycérophosphate de manganèse, l'acétate d'aluminium soluble ou le salicylate d'aluminium. De tels adjuvants sont décrits dans les demandes internationales de brevet publiées sous les numéros WO 96/32964 et WO 98/17311.

Comme autres adjuvants de l'immunité, notamment dans le cas de l'administration mucosale, on peut citer les composés sympathomimétiques décrits dans la demande internationale de brevet publiée sous le numéro WO 98/15288.

A l'occasion de ses recherches sur la mise au point de nouveaux adjuvants, la demanderesse a découvert, que certains agents tensioactifs eux-mêmes, possédaient une efficacité immunostimulante et que l'on pouvait ainsi préparer des compositions vaccinales aqueuses essentiellement exemptes de phase huileuse, comprenant un ou plusieurs de ces agents comme immunostimulant.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet, une composition sous forme d'une solution aqueuse comprenant :

(i) au moins un antigène ou au moins un générateur *in vivo* d'un composé comprenant une séquence d'acides aminés et,

(ii) et à titre d'adjuvant d'immunité, un agent tensioactif ou un mélange d'agents tensioactifs, ayant un nombre HLB global compris entre 5 et 15.

Par antigène ou au moins un générateur *in vivo* d'un composé comprenant une séquence d'acides aminés, on désigne soit des micro-organismes tués, tels que les virus, les bactéries ou les parasites, soit des fractions purifiées de ces micro-organismes, soit des micro-organismes vivants dont le pouvoir pathogène a été atténué. A titre de virus pouvant constituer un antigène selon la présente invention, on peut citer le virus de la rage, les herpès virus, tels que le virus de la

maladie d'Aujeszky, les orthomixovirus tels que Influenzae, les picornavirus tels que le virus de la fièvre aphteuse ou les rétrovirus tels que les VIH. A titre de micro-organisme du type bactérien pouvant constituer un antigène selon la présente invention, on peut citer E. Coli, et ceux des genres Pasteurella, Furonculosis, Vibriosis, Staphylococcus et Streptococcus. A titre de parasite, on peut citer 5 ceux des genres Trypanosoma, Plasmodium et Leishmania. On peut aussi citer les virus recombinants notamment les virus non enveloppés tels que les adénovirus, le virus de la vaccine, le virus Canarpox, les herpès virus ou les baculovirus. On désigne aussi un vecteur recombinant viral non enveloppé vivant, dont le gé- 10 nome contient, insérée de préférence dans une partie non essentielle pour la réplication du virus enveloppé correspondant, une séquence codant pour une sous-unité antigénique induisant une synthèse d'anticorps et/ou un effet protecteur contre le susdit virus enveloppé ou micro-organisme pathogène ; ces sous-unités antigéniques peuvent être par exemple, une protéine, une glycoprotéine, un peptide ou une fraction peptidique et/ou protectrice contre une infection par un micro-organisme vivant tel un virus enveloppé, une bactérie ou un parasite. Le gène 15 exogène inséré dans le micro-organisme peut être, par exemple, issu d'un virus Aujeszky ou HIV.

On peut citer notamment un plasmide recombinant constitué d'une séquence de nucléotides, dans laquelle est insérée une séquence nucléotidique exogène, provenant d'un micro-organisme ou d'un virus pathogène. Cette dernière séquence nucléotidique a pour but de permettre l'expression d'un composé comprenant une séquence d'acides aminés, ce composé ayant lui-même pour but de déclencher une réaction immunitaire dans un organisme hôte. 20

Par générateur "in vivo" d'un composé comprenant une séquence d'acides aminés, on désigne tout un produit biologique capable d'exprimer ledit composé dans l'organisme hôte dans lequel on a introduit ledit générateur in vivo. Le composé comprenant la séquence d'acides aminés, peut être une protéine, un peptide ou une glycoprotéine. Ces générateurs in vivo sont généralement obtenus par des 25 procédés issus du génie génétique. Plus particulièrement, ils peuvent consister en des micro-organismes vivants, généralement un virus, jouant le rôle de vecteur recombinant, dans lequel est insérée une séquence nucléotidique, notamment un

gène exogène. Ces composés sont connus en tant que tels et utilisés notamment comme vaccin sous unitaire recombinant. A cet égard, on peut se référer à l'Article de M. ELOIT et al., Journal of virology (1990) 71, 2925-2431 et aux demandes internationales de brevet publiées sous les numéros WO-A-91/00107 et WO-A-
5 94/16681. Les générateurs *in vivo* selon l'invention peuvent aussi consister en un plasmide recombinant comprenant une séquence nucléotidique exogène, capable d'exprimer dans un organisme hôte un composé comprenant une séquence d'acides aminés. De tels plasmides recombinants et leur mode d'administration dans un organisme hôte ont été décrits en 1990, par LIN et al., Circulation
10 82:2217,2221 ; COX et al., J. of VIROL, Sept. 1993, 67, 9, 5664-5667 et dans la demande internationale publiée sous le numéro WO 95/25542. Selon la nature de la séquence nucléotidique comprise dans le générateur *in vivo*, le composé comprenant la séquence d'acides aminés qui est exprimé au sein de l'organisme hôte, peut :

15 (i) être un antigène, et permettre le déclenchement d'une réaction immune,
(ii) avoir une action curative vis-à-vis d'une maladie, essentiellement une maladie d'ordre fonctionnel, qui s'est déclenchée chez l'organisme hôte. Dans ce cas, le générateur *in vivo* permet un traitement de l'hôte, du type thérapie génique.

20 A titre d'exemple, une telle action curative peut consister en une synthèse par le générateur *in vivo* de cytokines, comme les interleukines, notamment l'interleukine 2. Celles-ci permettent le déclenchement ou le renforcement d'une réaction immune visant à l'élimination sélective des cellules cancéreuses.

Une composition selon l'invention comprend une concentration en antigène
25 qui dépend de la nature de cet antigène et de la nature du sujet traité. Il est toutefois particulièrement remarquable qu'un adjuvant selon l'invention, permette de diminuer notablement la dose habituelle d'antigène requise. La concentration adéquate d'antigène peut être déterminée de manière classique par l'homme du métier. Généralement, cette dose est de l'ordre de $0,1\mu\text{g}/\text{cm}^3$ à $1\text{g}/\text{cm}^3$ plus généralement comprise entre $1\mu\text{g}/\text{cm}^3$ et $100\text{mg}/\text{cm}^3$.

30 La concentration dudit générateur *in vivo* dans la composition selon l'invention dépend, là encore, notamment de la nature dudit générateur et de l'hôte

dans lequel il est administré. Cette concentration peut être aisément déterminée par l'homme du métier, sur la base d'expérience de routine. A titre indicatif, on peut toutefois préciser que lorsque le générateur *in vivo* est un microorganisme recombinant, sa concentration dans la composition selon l'invention peut être comprise entre 10^2 et 10^{15} micro-organismes/cm³, de préférence entre 10^5 et 10^{12} micro-organismes/cm³. Lorsque le générateur *in vivo* est un plasmide recombinant, sa concentration dans la composition selon l'invention peut être comprise entre 0,01 et 100 g/dm³.

Au sens de la présente invention, le nombre HLB est calculé par la formule
10 HLB = 20 (1-I_s/I_a), dans laquelle I_s représente l'indice de saponification et I_a, l'indice d'acide dudit tensioactif ou dudit mélange d'agents tensioactifs. Ces deux indices, de saponification et d'acide, sont déterminés par des méthodes décrites dans la Pharmacopée européenne.

L'invention a principalement pour objet, une composition telle que définie
15 précédemment, dans laquelle le ou les agents tensioactifs sont choisis parmi les corps gras modifiés et de préférence le ou les agents tensioactifs sont choisis parmi les corps gras modifiés ayant un nombre HLB global compris entre 6 et 14.

Les corps gras modifiés utilisés dans le cadre de la présente invention,
peuvent être d'origine minérale végétale ou animale. Comme corps gras modifiés
20 d'origine minérale, il y a les huiles d'origine pétrolière. Comme corps gras modifiés d'origine végétale, il y a les huiles végétales modifiées, par exemple, les huiles modifiées d'arachide, d'olive, de sésame, de soja, de germes de blé, de pépins de raisin de tournesol, de ricin, de lin, de soja, de maïs, de coprah, de palme, de noix, de noisettes ou de colza. Comme corps gras modifiés d'origine animale, il
25 y a par exemple le squalane modifié, le squalène modifié, l'huile modifiée de spermaceti ou l'huile modifiée de suif.

Par corps gras modifiés, on désigne notamment les dérivés alkoxylés de corps gras et plus particulièrement les dérivés alkoxylés d'huiles ou les dérivés alkoxylés d'esters alkyliques d'huiles et plus particulièrement, les dérivés éthoxyliés et/ou propoxylés d'huiles ou les dérivés éthoxylés et/ou propoxylés des esters méthylique, éthylique, propyliques linéaire ou ramifié ou butyliques, linéaire ou ramifiés, desdites huiles. L'invention a plus spécifiquement pour objet une com-

position telle que définie précédemment, dans laquelle le corps gras modifié est choisi parmi les dérivés éthoxylés d'huiles ayant un nombre d'OE, compris entre 1 et 60.

L'invention a particulièrement pour objet, une composition telle que définie précédemment, dans laquelle le corps gras modifié est un dérivé alkoxylé d'huile de maïs ou un mélange de dérivés alkoxyrés d'huile de maïs, ayant un nombre HLB global compris entre 10 et 14 ou une composition telle que définie précédemment, dans laquelle le corps gras modifié est un dérivé éthoxylé d'huile de ricin ou un mélange de dérivés alkoxyrés d'huile de ricin, ayant un nombre HLB global compris entre 7 et 10. Comme exemples de telles compositions, il y a la composition dans laquelle le corps gras modifié est choisi parmi les dérivés éthoxylés d'huile de maïs ayant un nombre d'OE compris entre 20 et 40 ou la composition dans laquelle le corps gras modifié est un mélange de dérivés éthoxylés d'huile de ricin ayant un nombre d'OE égal à 7 et de dérivés éthoxylés d'huile de ricin ayant un nombre d'OE égal à 60.

Une composition objet de la présente invention, contient entre 0,2mg/cm³ et 500mg/cm³ d'adjuvant, plus particulièrement entre 2mg/cm³ et 500mg/cm³ d'adjuvant et de préférence entre 50mg/cm³ et 200mg/cm³ d'adjuvant.

Selon un deuxième aspect particulier de la présente invention, celle-ci a pour objet une composition telle que définie précédemment, dans laquelle le ou les agents tensioactifs sont choisis parmi les dérivés alkoxyrés d'esters d'acides gras et de polyols ou les dérivés alkoxyrés d'éthers d'alcools gras et de polyols, et plus particulièrement, les triglycérides d'acides gras alkoxyrés, les esters alkoxyrés de polyglycérol d'acides gras, les esters alkoxyrés d'acides gras avec un hexol, tel que par exemple le sorbitol ou le mannitol, ou les esters alkoxyrés d'acides gras avec un anhydride d'hexol, comme le sorbitane ou le mannitane.

Comme acides gras appropriés à la préparation de ces esters modifiés il y a plus particulièrement, ceux comportant de 12 à 22 atomes de carbone, avantagereusement un acide gras liquide à 20°C, tels que par exemple, ceux comportant de 16 à 18 atomes de carbone, comme l'acide oléique, l'acide ricinoléique ou l'acide isostéarique.

La composition, telle que définie ci-dessus, contient notamment, un ou plusieurs dérivés éthoxylés d'esters d'acides gras et de polyol ou dérivés éthoxylés d'éthers d'alcools gras et de polyols, ayant un nombre d'OE, compris entre 1 et 60. L'agent tensioactif ou le mélange d'agents tensioactifs de cette composition 5 telle que définie ci-dessus, a plus particulièrement un nombre HLB global compris entre 10 et 14 et de préférence entre 12 et 13,5. Comme exemple d'une telle composition, il y a celle dans laquelle l'agent tensioactif est un dérivé éthoxylé d'oléate de mannitane ayant un nombre d'OE compris entre 5 et 15, et, de préférence, entre 7 et 11.

10 Un agent tensioactif selon l'invention est de préférence pharmaceutiquement acceptable au niveau des muqueuses ; il doit notamment être dépourvu de métaux lourds et présenter des indices d'acides ou de peroxydes très faibles. Il est également souhaitable qu'il satisfasse aux normes des tests d'innocuité tels que, ceux décrits par S.S. Berlin, Annales of Allergy, 1962, 20, 473 ou les tests 15 de toxicité anormale décrits dans la Pharmacopée européenne.

La composition selon l'invention, peut comporter un agent stimulant immunitaire conventionnel tel l'Avridine®, la N,N-dioctadecyl-N',N'-bis(2-hydroxyéthyl) propanediamine, les dérivés du MDP (muramyl dipeptide), notamment le thréonyl-MDP, les dérivés de l'acide mycolique ou les dérivés du Lipide A.

20 La composition selon l'invention, peut comprendre un ou plusieurs sels organiques de cations métalliques hydrosolubles, tel que par exemple le gluconate de calcium, le gluconate de manganèse le salicylate d'aluminium ou l'acétate d'aluminium soluble. Lorsque la composition adjuvante selon l'invention comprend, un sel pharmaceutiquement acceptable, celui-ci est à une concentration de 25 0,02 à 3000 mg/ cm³, de préférence 0,1 à 1000 mg/cm³, plus préférentiellement de 0,1 à 150 mg/cm³.

La composition selon l'invention, peut comporter un composé sympathomimétique. Par composés sympathomimétiques, on désigne notamment les amphetamines, les catécholamines, les phénylesopropylamines ou la tyramine. 30 Comme exemples de tels composés, on peut citer notamment l'isoprotérénol, la L-Epinephrine, le lévartérénol, l'éphédrine, la phényléphédrine ou le salbutamol. Lorsque la composition adjuvante selon l'invention comprend un composé sym-

pathomimétique, celui-ci à un concentration de 10^{-10} molaire à 10^{-2} molaire, de préférence de 10^{-7} Molaire à 10^{-5} Molaire.

L'utilisation des agents tensioactifs tel que définis précédemment comme adjvant dans les compositions vaccinales et plus particulièrement dans les compositions vaccinales sans phase huileuse constitue un autre aspect de la présente invention.

La composition selon l'invention peut être utilisée comme médicament préventif ou curatif. Selon la nature de l'antigène ou du générateur in vivo, une composition selon l'invention peut être administrée à des poissons, des crustacés tels que les crevettes, des volailles, notamment, des oies, des dindes, des pigeons et des poulets, aux canidés tels le chien, aux félidés tels le chat, aux porcs, aux primates, aux bovidés, aux ovidés et aux chevaux. La composition selon l'invention peut être également administrée à l'homme. L'administration de la composition peut se faire de manière classique par voie parentérale, notamment par injection sous-cutanée, intramusculaire ou intrapéritonéale ou par voie mucosale notamment par voie orale, voie rectale, voie nasale, voie vaginale. Selon un autre aspect de l'invention, celle-ci consiste en l'utilisation d'un adjuvant tel que défini ci-dessus pour la préparation d'un vaccin destiné à la prévention ou au traitement d'une maladie infectieuse, notamment une maladie infectieuse engendrée par un virus ou un micro-organisme tels ceux mentionnés plus haut.

Selon un autre dernier aspect de la présente invention, celle-ci consiste en l'utilisation de cet adjuvant pour la préparation d'une composition destinée à soigner une maladie d'ordre fonctionnel, telle le cancer ou la mucoviscidose.

Exemple 1

On a injecté par voie sous-cutanée, à différents lots de 5 souris femelles de souche OF1 ayant un poids moyen de 18 à 20 grammes, 100 microlitres de différentes compositions contenant un agent tensioactif, du tampon phosphate (PBS) et 10 mg/cm^3 d'ovalbumine, à $t = 0$ avec un rappel à $t = 28$ jours.

On effectue les prélèvements sanguins à 14, 28, 42, 56, 90 et 180.jours

On procède à des dosages ELISA sur les prélèvements sanguins, des IgG1 pour déterminer la réponse immunitaire humorale et les IgG2a, pour déterminer la ré-

ponse immunitaire cellulaire. Les réactions locales sont évaluées à 7 jours et à 35 jours.

Les compositions sont les suivantes :

Tensioactif utilisé (TA) (Composition) % pondéraux	HLB du TA	TA en µl	Tampon (PBS) en µl	Antigène (10mg/cm ³) en µl
Huile de maïs éthoxylée (3OE) (Référence 1)	4,1	100	1900	20
Huile de maïs éthoxylée (10 OE) + 2% glycérol sur charge initiale (Composition A)	7,9	100	1900	20
Huile de maïs éthoxylée (20 OE) + 2% glycérol sur charge initiale (Composition B)	10,4	100	1900	20
Huile de maïs éthoxylée (30 OE) + 2% glycérol sur charge initiale (Composition C)	12,3	100	1900	20
Huile de maïs éthoxylée (40 OE) + 2% glycérol sur charge initiale (Composition D)	13,8	100	1900	20
Huile de maïs éthoxylée (20 OE) + 4% glycérol sur charge initiale (Composition E)	14,2	100	1900	20
Huile de maïs éthoxylée (40 OE) + 4% glycérol sur charge initiale (Composition F)	11,3	100	1900	20
Oléate de mannitane (5OE) (Composition G)	10,9	100	1900	20
Oléate de mannitane (8OE) (Composition H)	12,4	100	1900	20
Oléate de mannitane (10OE) (Composition I)	13,1	100	1900	20
Oléate de mannitane (15OE) (Composition J)	14,6	100	1900	20

Tensioactif utilisé (TA) (Composition) % pondéraux	HLB du TA	TA en µl	Tampon (PBS) en µl	Antigène (10mg/cm ³) en µl
Oléate de mannitane (20OE) (Composition K)	15,6	100	1900	20
Oléate de mannitane (40OE) (Composition L)	17,3	100	1900	20
Oléate de mannitane (Référence 2)	3,3	100	1900	20
Oléate de mannitane (8OE) (Composition M)	12,1	100	1900	20
Oléate de mannitane + Oléate de mannitane (8OE) (Composition N)	6,5	100	1900	20
Oléate de mannitane + Oléate de mannitane (8OE) (Composition O)	5,0	100	1900	20
gluconate de manganèse (Référence 3)	-	200	1800	20
Témoin	-	0	2000	20

Les résultats des tests ELISA sont les suivants :

Composition	Dosage des IgG (échelle de temps en jours)					
	J14	J28	J42	J56	J90	J180
Référence (1)	1500	1000	32000	48000	32000	6000
Composition (A)	1000	1000	8000	12000	3000	1500
Composition (B)	1000	1000	64000	64000	16000	8000
Composition (C)	2000	1000	96000	128000	128000	12000
Composition (D)	1500	1000	6000	32000	64000	6000
Composition (E)	1000	1000	32000	64000	96000	24000
Composition (F)	3000	8000	64000	128000	128000	32000

	D sag des IG1 (échelle de temps en jours)					
Composition	J14	J28	J42	J56	J90	J180
Composition (G)	2000	2000	8000	64000	48000	8000
Composition (H)	4000	8000	128000	128000	48000	16000
Composition (I)	4000	1000	128000	96000	48000	12000
Composition (J)	1000	2000	64000	24000	8000	2000
Composition (K)	1000	1000	24000	12000	2000	2000
Composition (L)	1000	1000	18000	6000	2000	2000
Référence (2)	1000	1000	32000	16000	3000	2000
Composition (M)	4000	4000	128000	128000	256000	48000
Composition (N)	1500	1000	128000	64000	32000	12000
Composition (O)	1000	1000	32000	20000	16000	2000
Référence (3)	32000	32000	256000	128000	32000	8000
Témoin	1000	1000	4000	2000	3000	1000

	Dosage des IG2a (échelle de temps en jours)					
Composition	J14	J28	J42	J56	J90	J180
Référence (1)	1000	1000	1000	1500	3000	1000
Composition (A)	1000	1000	1000	1000	2000	1000
Composition (B)	1000	1000	2000	2000	2000	1000
Composition (C)	1000	1000	4000	1500	3000	1000
Composition (D)	1000	1000	1000	2000	4000	1000
Composition (E)	1000	1000	1000	2000	3000	1000
Composition (F)	1000	1000	1000	6000	4000	1000
Composition (G)	1000	1000	1000	8000	3000	1000
Composition (H)	1000	1000	1000	3000	3000	1000
Composition (I)	1000	1000	4000	3000	2000	1000
Composition (J)	1000	1000	3000	1500	2000	1000
Composition (K)	1000	1000	1000	1500	2000	1000
Composition (L)	1000	1000	1000	1500	2000	1000
Référence (2)	1000	1000	1000	1500	3000	1000

	Dosage des IgG2a (éch II de temps en jours)					
Composition	J14	J28	J42	J56	J90	J180
Composition (M)	1000	1000	4000	1500	6000	1000
Composition (N)	1000	1000	4000	1500	2000	1000
Composition (O)	1000	1000	4000	1500	6000	1000
Référence (3)	1000	1000	4000	16000	2000	1000
Témoin	1000	1000	1000	1000	1000	1000

Exemple 2

On opère de la même manière qu'à l'exemple 1 avec comme tensioactifs,
5 les huiles de ricin éthoxylées suivantes :

Tensioactif utilisé (TA) (Composition) % pondéraux	HLB du TA	TA en µl	Tampon (PBS) en µl	Antigène (10mg/cm³) en µl
Huile de ricin éthoxylée : 100% (7OE) (Composition P)	6	100	1900	20
Huile de ricin éthoxylée : 89,13% (7 OE) + 10,87% (60 OE) (Composition Q)	7	100	1900	20
Huile de ricin éthoxylée : 78,26% (7 OE) + 21,74% (60 OE) (Composition R)	8	100	1900	20
Huile de ricin éthoxylée : 67,39% (7 OE) + 32,61% (60 OE) (Composition S)	9	100	1900	20
Huile de ricin éthoxylée : 56,52% (7 OE) + 43,487% (60 OE) (Composition T)	10	100	1900	20
Huile de ricin éthoxylée : 50% (7 OE) + 50% (60 OE) (Composition U)	10,6	100	1900	20

Tensioactif utilisé (TA) (Composition) % pondéraux	HLB du TA	TA en µl	Tampon (PBS) en µl	Antigène (10mg/cm ³) en µl
Huile de ricin éthoxylée : 45,65% (7 OE) + 54,35% (60 OE) (Composition V)	11	100	1900	20
Huile de ricin éthoxylée : 34,78% (7 OE) + 65,22% (60 OE) (Composition W)	12	100	1900	20
Huile de ricin éthoxylée : 23,91% (7 OE) + 76,09% (60 OE) (Composition X)	13	100	1900	20
Huile de ricin éthoxylée : 13,04% (7 OE) + 86,96% (60 OE) (Composition Y)	14	100	1900	20
Huile de ricin éthoxylée : 100% (60E) (composition Z)	15,2	100	1900	20
Témoin (T1)		1000	1000	20
Témoin (T2)		0	2000	20

Les résultats des tests ELISA sont les suivants :

Composition	Dosage des IgG (échelle de temps en jours)					
	J14	J28	J42	J56	J90	J180
Composition (P)	1600	600	8000	16000	12000	nd
Composition (Q)	3200	600	16000	64000	48000	nd
Composition (R)	2400	400	48000	64000	64000	nd
Composition (S)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Composition (T)	600	100	16000	32000	32000	nd
Composition (U)	100	100	8000	32000	32000	nd
Composition (V)	100	100	8000	12000	6000	nd
Composition (W)	nd	nd	nd	nd	nd	nd

	Dosage des IG1 (échelle de temps en jours)					
Composition	J14	J28	J42	J56	J90	J180
Composition (X)	200	100	3000	4000	3000	nd
Composition (Y)	400	100	4000	12000	8000	nd
Composition (Z)	100	100	8000	6000	6000	nd
témoin T1	19200	12800	256000	128000	128000	nd
Témoin T2	100	100	4000	2000	1500	nd

	Dosage des IG2a (échelle de temps en jours)					
Composition	J14	J28	J42	J56	J90	J180
Composition (P)	100	100	8000	3000	3000	nd
Composition (Q)	100	100	12000	4000	8000	nd
Composition (R)	100	100	32000	8000	8000	nd
Composition (S)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Composition (T)	100	100	16000	3000	8000	nd
Composition (U)	100	100	6000	4000	4000	nd
Composition (V)	100	100	4000	15000	2000	nd
Composition (W)	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Composition (X)	100	100	1000	1000	1000	nd
Composition (Y)	100	100	1000	1000	1000	nd
Composition (Z)	100	100	1000	1000	3000	nd
témoin T1	100	100	8000	3000	8000	nd
Témoin T2	100	100	1000	1000	1000	nd

REVENDICATIONS

1. Composition sous forme d'une solution aqueuse comprenant :
 - (i) au moins un antigène ou au moins un générateur *in vivo* d'un composé comprenant une séquence d'acides aminés; et,
 - (ii) et à titre d'adjuvant d'immunité un agent tensioactif ou un mélange d'agents tensioactifs, ayant un nombre HLB global compris entre 5 et 15.
2. Composition telle que définie à la revendication 1, dans laquelle le ou les agents tensioactifs sont choisis parmi les corps gras modifiés.
3. Composition telle que définie à la revendication 2, dans laquelle le ou les agents tensioactifs sont choisis parmi les corps gras modifiés ayant un nombre HLB global compris entre 6 et 14.
4. Composition telle que définie à l'une des revendications 2 ou 3, dans laquelle le corps gras modifié est choisi parmi les dérivés alkoxyrés d'huiles ou les dérivés alkoxyrés d'esters alkyliques d'huiles.
5. Composition telle que définie à la revendication 4, dans laquelle le corps gras modifié est choisi parmi les dérivés éthoxylés d'huiles ayant un nombre d'OE, compris entre 1 et 60.
6. Composition telle que définie à l'une des revendications 3 ou 4, dans laquelle le corps gras modifié est un dérivé alkoxylé d'huile de maïs ou un mélange de dérivés alkoxyrés d'huile de maïs, ayant un nombre HLB global compris entre 10 et 14.
7. Composition telle que définie à l'une des revendications 3 ou 4, dans laquelle le corps gras modifié est un dérivé éthoxylé d'huile de ricin ou un mélange de dérivés alkoxyrés d'huile de ricin, ayant un nombre HLB global compris entre 7 et 10.
8. Composition telle que définie à la revendication 6, dans laquelle le corps gras modifié est choisi parmi les dérivés éthoxylés d'huile de maïs ayant un nombre d'OE compris entre 20 et 40.
- 30 9. Composition telle que définie à la revendication 7, dans laquelle le corps gras modifié est un mélange de dérivés éthoxylés d'huile de ricin ayant un

nombre d'OE égal à 7 et d dérivés éthoxylés d'huile de ricin ayant un nombre d'OE égal à 60.

10. Composition telle que définie la revendication 1, dans laquelle le ou les agents tensioactifs sont choisis parmi les dérivés alkoxylés d'esters d'acides gras et de polyol ou les dérivés alkoxylés d'éthers d'alcools gras et de polyols, et plus particulièrement, parmi les triglycérides d'acides gras alkoxylés, les esters alkoxylés de polyglycérol d'acides gras, les esters alkoxylés d'acides gras avec un hexol, tel que par exemple le sorbitol ou le mannitol, ou les esters alkoxylés d'acides gras avec un anhydride d'hexol, comme le sorbitane ou le mannitane.

11. Composition telle que définie aux revendications 1 et 10, dans laquelle le ou les agents tensioactifs sont choisis parmi les dérivés éthoxylés d'esters d'acides gras et de polyol ou les dérivés éthoxylés d'éthers d'alcools gras et de polyols, ayant un nombre d'OE, compris entre 1 et 60.

12. Composition telle que définie à l'une des revendications 10 ou 11, dans laquelle l'agent tensioactif ou le mélange d'agents tensioactifs a un nombre HLB global compris entre 10 et 14. et de préférence entre 12 et 13,5.

13. Composition telle que définie aux revendications 11 et 12, dans laquelle l'agent tensioactif est un dérivé éthoxylé d'oléate de mannitane ayant un nombre d'OE compris entre 5 et 15 et de préférence entre 7 et 11.

14. Composition telle que définie à l'une des revendications 1 à 13, comprenant en outre un stimulant immunitaire tel que l'Avridine®, les dérivés du MDP, les dérivés de l'acide mycolique ou les dérivés du lipide A.

15. Composition telle que définie à l'une des revendications 1 à 14, comprenant en outre un ou plusieurs sels organiques de cations métalliques hydrosolubles, tel que le gluconate de calcium, le gluconate de manganèse, le salicylate d'aluminium ou l'acétate d'aluminium soluble.

16. Composition telle que définie à l'une des revendications 1 à 15, comportant en outre un composé sympathomimétique choisi parmi les sympathomimétiques amines telles qu'une catécholamine, une amphétamine, une phénylisopropylamine ou la tyramine et, de préférence, choisi parmi l'éphédrine ou l'isoproterénol, la L-Epinephrine, le lévartérénol, l'éphédrine, la phénylephédrine ou le salbutamol.

17. Composition selon l'une des revendications 1 à 16, pour la mise en œuvre d'une méthode de traitement du corps humain ou animal.

18. Médicament selon la revendication 17, destiné à traiter ou à prévenir les maladies infectieuses et/ou fonctionnelles et notamment les maladies engendrées par un virus, un microorganisme ou un parasite telles que les maladies respiratoires.

19. Utilisation de l'agent tensioactif ou du mélange d'agents tensioactifs, tels que définis à l'une des revendications 1 à 14, comme adjuvant dans les compositions vaccinales et plus particulièrement les compositions vaccinales destinées à la vaccination muqueuse, notamment orale, nasale, rectale ou vaginale.

20. Utilisation de l'agent tensioactif ou du mélange d'agents tensioactifs, tels que définis à l'une des revendications 1 à 14, comme adjuvant dans les compositions vaccinales et plus particulièrement, dans les compositions vaccinales sans phase huileuse.

REVENDICATIONS

1. Composition sous forme d'une solution aqueuse comprenant :

(i) au moins un antigène ou au moins un générateur *in vivo* d'un composé
5 comprenant une séquence d'acides aminés; et,
(ii) et à titre d'adjvant d'immunité un agent tensioactif ou un mélange d'agents
tensioactifs, ayant un nombre HLB global compris entre 5 et 15.

2. Composition telle que définie à la revendication 1, dans laquelle le ou les agents tensioactifs sont choisis parmi les corps gras modifiés.

10 3. Composition telle que définie à la revendication 2, dans laquelle le ou les agents tensioactifs sont choisis parmi les corps gras modifiés ayant un nombre HLB global compris entre 6 et 14.

15 4. Composition telle que définie à l'une des revendications 2 ou 3, dans laquelle le corps gras modifié est choisi parmi les dérivés alkoxylés d'huiles ou les dérivés alkoxylés d'esters alkyliques d'huiles.

5. Composition telle que définie à la revendication 4, dans laquelle le corps gras modifié est choisi parmi les dérivés éthoxylés d'huiles ayant un nombre d'OE, compris entre 1 et 60.

20 6. Composition telle que définie à l'une des revendications 3 ou 4, dans laquelle le corps gras modifié est un dérivé alkoxylé d'huile de maïs ou un mélange de dérivés alkoxylés d'huile de maïs, ayant un nombre HLB global compris entre 10 et 14.

25 7. Composition telle que définie à l'une des revendications 3 ou 4, dans laquelle le corps gras modifié est un dérivé éthoxylé d'huile de ricin ou un mélange de dérivés alkoxylés d'huile de ricin, ayant un nombre HLB global compris entre 7 et 10.

8. Composition telle que définie à la revendication 6, dans laquelle le corps gras modifié est choisi parmi les dérivés éthoxylés d'huile de maïs ayant un nombre d'OE compris entre 20 et 40.

30 9. Composition telle que définie à la revendication 7, dans laquelle le corps gras modifié est un mélange de dérivés éthoxylés d'huile de ricin ayant un nombre d'OE égal à 7 et de dérivés éthoxylés d'huile de ricin ayant un nombre d'OE égal à 60.

10. Composition telle que définie la revendication 1, dans laquelle le ou les agents tensioactifs sont choisis parmi les dérivés alkoxyrés d'esters d'acides gras et de polyol ou les dérivés alkoxyrés d'éthers d'alcools gras et de polyols, et plus particulièrement, parmi les triglycérides d'acides gras alkoxyrés, les esters 5 alkoxyrés de polyglycérol d'acides gras, les esters alkoxyrés d'acides gras avec un hexol, tel que par exemple le sorbitol ou le mannitol, ou les esters alkoxyrés d'acides gras avec un anhydride d'hexol, comme le sorbitane ou le mannitane.

11. Composition telle que définie aux revendications 1 et 10, dans laquelle le ou les agents tensioactifs sont choisis parmi les dérivés éthoxylés 10 d'esters d'acides gras et de polyol ou les dérivés éthoxylés d'éthers d'alcools gras et de polyols, ayant un nombre d'OE, compris entre 1 et 60.

12. Composition telle que définie à l'une des revendications 10 ou 11, dans laquelle l'agent tensioactif ou le mélange d'agents tensioactifs a un nombre HLB global compris entre 10 et 14. et de préférence entre 12 et 13,5.

15 13. Composition telle que définie aux revendications 11 et 12, dans laquelle l'agent tensioactif est un dérivé éthoxylé d'oléate de mannitane ayant un nombre d'OE compris entre 5 et 15 et de préférence entre 7 et 11.

20 14. Composition telle que définie à l'une des revendications 1 à 13, comprenant en outre un stimulant immunitaire tel que l'Avridine®, les dérivés du MDP, les dérivés de l'acide mycolique ou les dérivés du lipide A.

15. Composition telle que définie à l'une des revendications 1 à 14, comprenant en outre un ou plusieurs sels organiques de cations métalliques hydrosolubles, tel que le gluconate de calcium, le gluconate de manganèse, le salicylate d'aluminium ou l'acétate d'aluminium soluble.

25 16. Composition telle que définie à l'une des revendications 1 à 15, comportant en outre un composé sympathomimétique choisi parmi les catécholamines, les amphétamines; les phénylisopropylamines ou la tyramine et, de préférence, choisi parmi l'éphédrine ou l'isoprotérénol, la L-Epinephrine, le lévartérénol, l'éphédrine, la phényléphédrine ou le salbutamol.

30 17. Composition selon l'une des revendications 1 à 16, pour la mise n œuvre d'une méthode de traitement du corps humain ou animal.

18. Médicament selon la revendication 17, destiné à traiter ou à prévenir les maladies infectieuses et/ou fonctionnelles et notamment les maladies engendrées par un virus, un microorganisme ou un parasite.

17

19. Utilisation de l'agent tensioactif ou du mélange d'agents tensioactifs, tels que définis à l'une des revendications 1 à 13, comme adjuvant dans les compositions vaccinales et plus particulièrement les compositions vaccinales destinées à la vaccination muqueuse, notamment orale, nasale, rectale ou 5 vaginale.

20. Utilisation de l'agent tensioactif ou du mélange d'agents tensioactifs, tels que définis à l'une des revendications 1 à 13, comme adjuvant dans les compositions vaccinales et plus particulièrement, dans les compositions vaccinales sans phase huileuse.

10

Corresponds to U.S. PATENT Application of
Jérôme AUCOUTURIER et al.

Filed: October 30, 2000
For: NOVEL VACCINE COMPOSITION AND USE OF
SURFACTANTS AS ADJUVANTS OF IMMUNITY

NIXON PEABODY LLP
(703) 790-9110

Atty.Docket: 746200-000062